



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**“RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN HÍGADOS DE POLLO
COMERCIALIZADOS EN EL MERCADO MODELO DE PIURA, POR EL MÉTODO
MICROBIOLÓGICO DE LAS TRES PLACAS”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO**

PRESENTADA POR:

Bach. RAY IRWIN ALBUJAR CANOVA

PIURA – PERÚ

2015

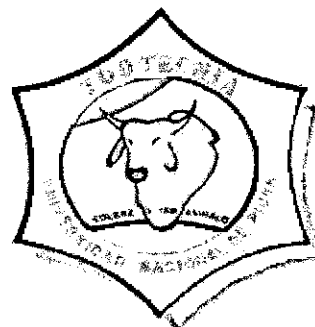
7665
ALB



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**“RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN HÍGADOS DE POLLO
COMERCIALIZADOS EN EL MERCADO MODELO DE PIURA, POR EL MÉTODO
MICROBIOLÓGICO DE LAS TRES PLACAS”**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO**

PRESENTADA POR:

Bach. RAY IRWIN ALBÚJAR CÁNOVA

PIURA – PERÚ

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

**“RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN HÍGADOS DE POLLO
COMERCIALIZADOS EN EL MERCADO MODELO DE PIURA, POR EL MÉTODO
MICROBIOLÓGICO DE LAS TRES PLACAS”**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO**

RESPONSABLES:

Bach. RAY IRWIN ALBUJAR CANOVA

EJECUTOR

Med. Vet. ROSARIO NELLY ELERA OJEDA. Dra.

. PATROCINADORA

PIURA, PERÚ

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

**RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN HÍGADOS DE POLLO
COMERCIALIZADOS EN EL MERCADO MODELO DE PIURA, POR EL MÉTODO
MICROBIOLÓGICO DE LAS TRES PLACAS**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO**

JURADO:

**Mblg. CÉSAR TORRES DIAZ. Dr.
PRESIDENTE**

**Med. Vet. JUAN SÁNCHEZ ACOSTA. Ms.
VOCAL**

**Med. Vet. ROSMERY CRUZ CERNA. Ms.
SECRETARIA**

PIURA – PERÚ

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE ZOOTECNIA
SECRETARIA ACADÉMICA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, se reunieron en acto académico para la sustentación de la tesis presentada por el Bachiller **RAY IRWIN ALBÚJAR CÁNOVA**, denominada, **"RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN HÍGADOS DE POLLO COMERCIALIZADOS EN EL MERCADO MODELO DE PIURA, POR EL MÉTODO MICROBIOLÓGICO DE LAS TRES PLACAS"**, para cumplir con el requisito académico para la obtención del Título Profesional de Médico Veterinario.

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo de investigación, así como los conocimientos demostrados por el sustentante, lo declaramos:

A P R O B A D O

En consecuencia, queda en condición de ser considerado apto por el Consejo Universitario y recibir el título profesional de **Médico Veterinario**, de conformidad con lo estipulado en el Art. 98º del Estatuto de la Universidad Nacional de Piura.

Castilla (Piura), 11 de diciembre del 2015

Mcblog. César Torres Díaz. Dr.
Presidente

Méd.Vet. Juan S. Sánchez Acosta.
Vocal

Méd. Vet. Rosmery Cruz Cerna. Ms.
Secretaria

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. ANTECEDENTES	3
2.2. MARCO TEÓRICO	4
2.2.1. Antimicrobianos	4
2.2.1.1. Terapéutica	4
2.2.1.2. Profilaxis	5
2.2.1.3. Promotor de crecimiento	5
2.2.2. Antimicrobianos que se determinaron mediante el método microbiológico de las tres placas	6
2.2.2.1. Tetraciclinas	6
2.2.2.2. Sulfamidas	7
2.2.2.3. Aminoglucosidos	7
2.2.3. Metabolismo y excreción de los antimicrobianos	7
2.2.3.1. Biotransformación hepática	8
2.2.3.2. Excreción biliar	8
2.2.4. Residuos de antimicrobianos y su importancia en salud pública	8
2.2.4.1. Residuos de antimicrobianos	9
2.2.4.2. Resistencia bacteriana	10
2.2.4.3. Toxicidad	10
2.2.4.4. Reacciones inmunopatológicas	11
2.2.5. Diagnóstico de residuos de antibióticos en alimentos	11
2.2.5.1. Microorganismos indicadores	11
2.2.5.2. Técnica rápida	12
2.2.5.3. Método de las cuatro placas	13
2.2.5.4. Método de las tres placas	14
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	16

3.2. DURACIÓN DEL ESTUDIO.....	16
3.3. MATERIALES.....	16
3.3.1. Material para toma de muestra.....	16
3.3.2. Material biológico.....	17
3.3.3. Material de laboratorio.....	17
3.3.4. Medios de cultivo.....	18
3.3.5. Reactivos.....	18
3.4. EQUIPOS.....	18
3.5. METODOLOGÍA.....	18
3.5.1. Toma de muestras.....	19
3.5.2. Preparación de agar test pH 6,0 y 8,0 para test de inhibición.....	19
3.5.3. Distribución de agar en placas Petri.....	20
3.5.4. Obtención, identificación de <i>Bacillus subtilis</i> y sembrado de placas.....	20
3.5.5. Procesamiento de muestras.....	20
3.5.6. Lectura de resultados.....	21
3.6. EVALUACIÓN DE DATOS.....	21
3.6.1. Unidad de análisis.....	21
3.6.2. Muestra.....	22
3.6.3. Población.....	23
3.6.4. Diseño y Análisis estadístico.....	23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Detección de residuos de antimicrobianos en muestras de hígados de pollo.....	24
4.2. Detección de antimicrobianos en muestras de hígado de pollo a tres pH diferentes.....	26
4.3. Detección de hígados positivos en 1, 2 o 3 medios con diferente pH.....	28
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	30
CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES.....	31
CAPÍTULO VII. RESUMEN.....	32
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	33
ANEXOS.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA

PÁGINA

01. Sensidiscos y trozos de tejidos depositados sobre el sustrato de cultivo a tres niveles de pH	14
02. Determinación del tamaño del halo de inhibición formado del trozo del tejido.....	15
03. Hígados positivos, negativos y sospechosos al método de las tres placas	24
04. Hígados positivos, negativos y sospechosos en el medio pH 6,0; pH 7,2 y pH 8,0	27
05. Resultados de hígados positivos a antimicrobianos en los diferentes medios.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Grupo de inhibidores y pH asignado a cada placa en estudio.....	15
2. Porcentaje de hígados obtenidos del mercado modelo de Piura que resultaron positivos, sospechosos y negativos a la prueba de detección de residuos de antimicrobianos	24
3. Resultados a la detección de Tetraciclinas (pH 6,0), sulfametoxazol/trimetoprim (pH 7,2) y Gentamicina (pH 8) en muestras de hígado de pollo	26
4. Resultado de hígados positivos en 3 medios, 2 medios y en un medio a diferentes pH	28

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1: FOTOS DE TOMAS DE MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO.....	36
2: OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Bacillus subtilis</i>	43
3: PROTOCOLO DE MUESTREO.....	44

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Si bien el uso de medicamentos con fines terapéuticos, profilácticos y promotores de crecimiento en animales destinados al consumo humano resulta benéfica en términos económicos como sanitarios al mejorar la rentabilidad de una explotación y el bienestar animal; los residuos de esos medicamentos pueden llegar al consumidor a través de productos y subproductos animales produciendo efectos nocivos como: reacciones alérgicas, resistencia bacteriana, efectos tóxicos e inclusive perturbación de la flora microbiana intestinal. Por lo tanto, el periodo de retiro de los antimicrobianos en los animales tratados debe respetarse para que los alimentos obtenidos a partir de animales tratados, no presenten residuos de antimicrobianos o éstos se encuentren por debajo de sus límites máximos permitidos.

A pesar que el reglamento tecnológico de carnes menciona que no se deben beneficiar animales que se encuentren en tratamiento con antimicrobianos hasta que su poder residual haya sido eliminado; éste no contempla como determinarlos y tampoco existen programas de monitoreo en los canales. Tanto Merino (2006) como Azareño y Chiroque (2010) manifiestan que la inspección veterinaria no es suficiente ya que no se logra detectar residuos de sustancias antimicrobianas que pudieran estar presentes en el organismo animal. Por esta razón se planteó realizar esta investigación para establecer la presencia de residuos de antimicrobianos en vísceras de pollo y resolver el siguiente problema ¿Si los hígados de pollo comercializados en el mercado Modelo de Piura presentaban residuos de antimicrobianos?

No existen antecedentes sobre estudios de presencia de residuos de antimicrobianos en carne o hígado de pollo en la ciudad de Piura, por lo tanto el objetivo del presente trabajo de investigación fue establecer la presencia de residuos de antimicrobianos en hígados de pollo comercializados en el mercado Modelo de Piura y de manera específica se buscó determinar residuos de tetraciclina, sulfamidas y aminoglucósidos en hígados de pollo, mediante el método microbiológico de las tres placas. La hipótesis planteada fue que “si el uso de sustancias antimicrobianas con diferentes fines durante el crecimiento del pollo en nuestro país es de forma indiscriminada debido a la escasa vigilancia y control, por lo tanto se pueden presentar residuos de antimicrobianos en hígados de pollo destinados al consumo humano”.

Los resultados obtenidos permiten tener fundamentos que justifiquen programas de control de uso de antimicrobianos en aves beneficiadas respetando el tiempo de retiro de los medicamentos y para que las instituciones involucradas en la inspección de alimentos de origen animal utilizados para el consumo humano como la Universidad Nacional de Piura (UNP), el Ministerio de Salud (MINSA), Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) y Municipalidades utilicen esta técnica en los centros de beneficio para la detección, posterior decomiso por el médico veterinario y sanción emitida por las instituciones involucradas.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

En la investigación “Determinación de residuos de sustancias antimicrobianas en gallinas de postura” realizado en Guadalajara – México, se analizaron 153 muestras de musculo mediante el método de la triplaca, resultando 49 muestras positivas y 104 negativas, a partir de 120 muestras de hígado, 73 resultaron positivas, 29 negativas y 18 dudosas y detección de tetraciclinas en huesos mediante la técnica de luz ultravioleta, resultando de 247 muestras de hueso, el 100% negativas (Merino, 2006).

En el trabajo “Determinación de residuos de tetraciclina en carnes de pollo que se consumen en la ciudad de Guatemala”, se analizaron 30 muestras de las principales granjas avícolas de la ciudad de Guatemala mediante el método de Cromatografía líquida de alta resolución, resultando 3 muestras, de las 30 analizadas, con presencia de tetraciclinas; estando presente en todas ellas la oxitetraciclina (0,067 – 0,567 ppm) y en una la clortetraciclina (3,7 ppm). Las tres muestras presentaron contenidos mayores a los niveles máximos de residuos aceptables para el consumo humano ($\leq 0,25$ ppm) establecidos por la Administración de alimentos y drogas de Estados Unidos (Orozco & Velásquez 2014).

En el estudio “Detección y cuantificación de los residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima cercado”, se analizaron 20 muestras, mediante el método microbiológico de difusión de las cuatro placas. En las muestras analizadas se observó zonas de inhibición entre 2 – 3,62 mm, lo cual confirma que la presencia de residuos antimicrobianos sobrepasan los límites máximos permitidos por la Unión Europea para el 100% de las muestras de los cuatro mercados en las muestras analizadas (Azañero & Chiroque, 2010).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Antimicrobianos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) manifiesta que el término antimicrobiano reúne a todas las sustancias capaces de inhibir el crecimiento microbiano incluyendo antibióticos (sintetizado por un microorganismo) y quimioterápicos (sintetizados químicamente) (Zuñiga, 2010).

Los antimicrobianos se utilizan fundamentalmente en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, pero muchos de ellos también se incorporan como aditivos a los piensos buscando una acción profiláctica o como promotores del crecimiento (Zuñiga, 2010).

2.2.1.1. Terapéutica

Los antimicrobianos son utilizados con fines terapéuticos, como tratamiento de una infección documentada, esta es la forma ideal de tratamiento antimicrobiano conociendo el germen causal de la infección. Muchas veces el tratamiento comienza de forma empírica en casos de sospecha de infección cuando se considera urgente la necesidad del mismo. Siempre que sea posible es importante realizar cultivos pertinentes previos, antes de instaurar el tratamiento, para poder valorar a posteriormente la eficacia de los antibióticos utilizados. Es preferible además recurrir siempre a antibióticos de espectro reducido para poder aumentar la eficacia del tratamiento y reducir el eventual trastorno que el antibiótico ejercerá sobre la flora comensal. Únicamente se recomienda la asociación de antibióticos cuando estos presentan efectos aditivos o sinérgicos. Las dosis deben ser siempre terapéuticas (corto periodo de tiempo y en dosis altas) puesto que los laboratorios farmacéuticos realizan los ensayos clínicos y los estudios cinéticos pertinentes que garantizan, para la dosis propuesta, unos niveles de fármaco adecuados para eliminar la bacteria (Cancho, García & Simal, 2000).

La vía de administración preferida por veterinarios, varía en función de las especies animales, aunque la alimentación mediante piensos adicionados con

medicamentos es una de las más usadas a la hora de medicar en los sectores zootécnicos, en aves se suele utilizar el agua de consumo diario para estos fines (Azañero & Chiroque, 2010).

2.2.1.2. Profilaxis

Los antimicrobianos deben utilizarse con fines profilácticos, solamente en aquellos casos en que este demostrado su importancia para prevenir una infección al realizar un procedimiento determinado y mientras dure este; por ejemplo, en los ciclos iniciales de crecimiento de animales, especialmente sensibles a agentes infecciosos muy particulares. En estos casos no deberían emplearse antibióticos de adquisición reciente ya que en general son menos eficaces como preventivos de infección que los ya existentes y podrían favorecer además la aparición de resistencias (Azañero & Chiroque, 2010).

Los piensos constituyen una de las vías de administración más usadas para suministrar fármacos con fines profilácticos, los antimicrobianos se incorporan a los piensos en forma de premezclas medicamentosas solidas o liquidas a concentraciones bajas y son utilizados por periodos relativamente prolongados (Cancho et al, 2000).

2.2.1.3. Promotor de crecimiento

Los antimicrobianos utilizados como promotores de crecimiento favorecen el control de la flora bacteriana del animal, lo que se traduce en un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un aumento considerable del peso. En este caso se incorpora al pienso en forma de aditivo, a concentraciones subterapéuticas y administrado por periodos muy prolongados (Cancho et al, 2000).

Los antimicrobianos promotores del crecimiento pueden dar mejoras en la ganancia diaria de peso y en el índice de conversión de alimentos en un orden de 3-5% en pollos de engorde. Además de los beneficios económicos, las principales ventajas para los ganaderos son mayor uniformidad de crecimiento, estabilización de la flora intestinal en los animales, y mantenimiento de la salud en casos de

estrés medio ambiental en un grado que se puede decir que estos antimicrobianos promotores de crecimiento actúan profilácticamente, es decir reducen la morbilidad (Azañero & Chiroque, 2010).

2.2.2. Antimicrobianos que se determinaron mediante el método microbiológico de las tres placas

2.2.2.1. Tetraciclinas

La oxitetraciclina y clortetraciclina siguen siendo las tetraciclinas de mayor uso, por su favorable precio; en términos de absorción, la oxitetraciclina se absorbe mejor que la clortetraciclina (Serrano, 2015).

Una vez absorbidas, las tetraciclinas se unen a proteínas plasmáticas en diferente grado dependiendo de la especie. Las tetraciclinas se distribuyen extensamente en la mayoría de los tejidos del cuerpo después de una administración oral o intravenosa y se acumulan en el hígado y los riñones (Adams, 2003).

La oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina son absorbidos del tracto gastrointestinal rápida y moderadamente, siendo la absorción más baja para la clortetraciclina. Después de la absorción por las diferentes rutas de administración, estos tres compuestos de tetraciclina son ampliamente distribuidos en el organismo llegando incluso al hueso, con las concentraciones más altas en riñón e hígado (Adams, 2003).

Vale la pena recordar que las tetraciclinas se quelan con iones de Calcio, Magnesio, Hierro y Aluminio, disminuyendo así su biodisponibilidad, por lo tanto las aguas duras inciden bastante en la absorción. La doxiciclina no es interferida en su absorción por los iones de calcio (Serrano, 2015).

2.2.2.2. Sulfamidas

Las sulfonamidas todavía tienen un papel en la terapéutica aviar, al ser mezcladas con el trimetoprim (Serrano, 2015).

La mayor parte de las sulfonamidas se absorben bien en el intestino. Se distribuyen ampliamente por el organismo y en muchos tejidos blandos, incluidos el sistema nervioso central y las articulaciones. Las sulfamidas se excretan por riñón, ya sea como compuestos originales o como metabolitos. Las sulfamidas se excretan también en las lágrimas, heces, bilis, leche, sudor, jugos pancreáticos, gástrico e intestinal y saliva (Sumano, 2006).

2.2.2.3. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos suelen causar nefrotoxicidad; son ineficaces contra las bacterias anaerobias, pero son activos contra gram negativos y algunos gram positivos (Botana, 2002).

Los aminoglucósidos más conocidos en el campo aviar son la neomicina, la kanamicina, la gentamicina y la apramicina. Como antibióticos aminoglucósidos, estos antibióticos tienen baja absorción oral y su uso por esta vía no permite obtener niveles séricos; por lo tanto su uso sería para combatir enfermedades en el ámbito entérico (Serrano, 2015).

2.2.3. Metabolismo y excreción de los antimicrobianos

La eliminación total e irreversible del fármaco se lleva a cabo habitualmente por la combinación de dos componentes, metabolismo y excreción. Los procesos de metabolismo o biotransformación de fármacos conducen a la transformación química del compuesto original y su conversión en un metabolito o metabolitos que se excretan con mayor facilidad. El metabolismo de los fármacos se lleva a cabo habitualmente por medio de procesos enzimáticos de naturaleza hepática. La excreción de fármacos consiste en la eliminación del fármaco intacto o de sus metabolitos. Además de la orina otras vías de excreción las constituyen la bilis, saliva, leche o incluso el aire

espirado. Aunque diversos órganos exhiben capacidad para metabolizar sustancias químicas, el hígado es el órgano principal del metabolismo de los fármacos (Botana, 2002).

2.2.3.1. Biotransformación hepática

Aunque diversos tejidos exhiben capacidad de biotransformación, los procesos enzimáticos que tienen lugar en el hígado son los principales responsables de la transformación bioquímica de fármacos. Por regla general, los fármacos que exhiben un mayor carácter lipófilo tienen mejor acceso al medio intracelular, donde tienen lugar los procesos de biotransformación. La consecuencia habitual es la síntesis de metabolitos más polares (hidrófilos) que el compuesto original y que, por tanto, se eliminan más fácilmente por excreción renal o biliar; de hecho, la transformación metabólica es, conceptualmente, la forma que el organismo tiene de garantizar que una molécula pueda eliminarse, lo cual se consigue mediante el aumento de su polaridad (Botana, 2002).

2.2.3.2. Excreción biliar

La bilis es un producto de excreción hepática, que los hepatocitos producen de forma continua y que se almacena en la vesícula biliar. La bilis es la ruta excretora más importante para algunos fármacos y metabolitos polares y de alto peso molecular. El carácter polar de los compuestos que se eliminan por esta vía impide que se reabsorban con facilidad desde el conducto biliar o desde el intestino. Los compuestos químicos excretados por vía biliar se suelen eliminar por las heces. Las aves en general tienen una alta capacidad de excreción biliar (Botana, 2002).

2.2.4. Residuos de antimicrobianos y su importancia en salud pública

Tanto en la práctica humana, como en la veterinaria la principal preocupación en la selección y empleo de fármacos es su efecto terapéutico final, es decir, si son o no eficaces frente a la enfermedad que se trata. Las dosis se administran generalmente siguiendo las recomendaciones o reglas del prospecto y si se administran dosis

mayores lo que más preocupa es su toxicidad potencial. Si bien este razonamiento es cierto en gran parte de los animales, los veterinarios y ganaderos implicados en el tratamiento de las enfermedades de estos animales se encuentran con una preocupación adicional, la persistencia de los residuos medicamentosos después de ser tratado el proceso patológico (Adams, 2003).

Puesto que existe el riesgo que los residuos de medicamentos o sus metabolitos persistan en el animal y en los alimentos obtenidos a partir de él, llegando a la cadena de alimentación humana. Esto tiene importantes repercusiones en la calidad de los alimentos y sobretodo en el campo de la salud pública, pudiendo ocasionar resistencia bacteriana, toxicidad, reacciones inmunopatológicas o inclusive alteración de la flora intestinal. (Cancho et al, 2000).

Algunas drogas veterinarias son potencialmente tan peligrosas que la FDA (Food and Drugs Administration) prohíbe totalmente su uso en animales de consumo, son el caso del cloranfenicol y los nitrofuranos. La administración prolongada o sobredosificación de nitrofuranos produce problemas en la fertilidad, cardíacos y reducción de la producción mientras que los residuos de cloranfenicol pueden producir en el humano anemia aplásica que puede llegar a ser letal. Los residuos de cloranfenicol y sus metabolitos son encontrados en todos los tejidos comestibles, leche y huevos (Adams, 2003).

2.2.4.1. Residuo de antimicrobiano

Son los compuestos que permanecen en el organismo animal como consecuencia de un tratamiento, incluyendo el principio activo original y/o los productos de biotransformación (metabolitos). La presencia de estos residuos en mayor o menor proporción, está relacionada con: la naturaleza del producto, la dosis utilizada, la forma de aplicación y el tiempo transcurrido desde su aplicación hasta la faena (en el caso de la carne y las vísceras) o hasta la recolección del producto (cuando se trata de leche y huevos). Los efectos de estos residuos pueden, desde ser nulos, sus cantidades son ínfimas y son consumidos ocasionalmente, hasta tener consecuencias graves, si se ingieren diariamente y se acumulan en nuestros tejidos (Pérez, 2005).

2.2.4.2. Resistencia bacteriana

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los problemas de salud pública más graves del mundo, muchas bacterias han dejado de responder a los antimicrobianos de uso, por el uso excesivo de los antibióticos compuestos y la falta de nuevos agentes en el mercado. El desarrollo de la resistencia bacteriana esta principalmente basado en dos factores: la presión selectiva por el empleo de antibióticos y la presencia de genes de resistencia (Chávez, 2008).

La aplicación a gran escala de los antibióticos conlleva una presión selectiva que ha favorecido la diseminación de cepas bacterianas resistentes. Esto se debe a que los agentes de resistencia pueden provenir de mutaciones espontaneas y quedar fijadas genéticamente, actuando en respuesta o adquiriendo una codificación de genes adicionales para un mecanismo de resistencia (Trolldenier, 1980).

Los mecanismos genéticos de la resistencia bacteriana son debido a mecanismos que involucran al ADN cromosomal, como en la mutación o por adquisición de material genético extracromosomal, por transformación, conjugación y transducción. La presencia de los genes resistencia pueden encontrarse formando parte de la flora de distintos nichos ecológicos y por lo tanto transmitirse según su cadena epidemiológica (fuente de infección, mecanismo de transmisión, y huésped sensible), de una persona a otra, de un animal a otro, de un animal a persona, de un animal a un alimento, o de un alimento a una persona (Chávez, 2008).

2.2.4.3. Toxicidad

Los efectos de los residuos no se manifiestan con un problema de toxicidad aguda, nadie se enfermará por consumir “algunas veces” un alimento animal con residuos de medicamentos. La manifestación es a largo plazo, por la ingestión de pequeñas cantidades de residuos en forma continua y por períodos prolongados, estos efectos pueden englobarse en dos grandes grupos: (Azareño & Chiroque, 2010)

a) Efectos directos: Son aquellos producidos por la utilización de antimicrobianos en condiciones terapéuticas. Se manifiestan dentro de amplias y variadas formas clínicas como toxicidad en riñón, hígado, sangre, médula, oído, efectos teratogénicos, carcinogénicos y alergias graves (Azareño & Chiroque, 2010).

b) Efectos indirectos: Están representados por las formas de alergia y los fenómenos de resistencia bacteriana (Azareño & Chiroque, 2010).

Estudios recientes indican que las sulfamidas (en particular la sulfametazina) pueden ser carcinogénicas en personas que consuman pequeñas cantidades durante largos periodos de tiempo (Sumano, 2006).

2.2.4.4. Reacciones inmunopatológicas

Se debe al consumo de pequeñas dosis de antimicrobianos presentes en los alimentos que pueden producir hipersensibilidad, de manera que al tratar a las personas sensibles con el antibiótico respectivo se presentan reacciones adversas que van desde un simple prurito hasta el shock anafiláctico (Gesche & Emilfork, 1998).

2.2.5. Diagnóstico de residuos de antibióticos en alimentos

La detección de los residuos de antibióticos generalmente se determina por técnicas biológicas, las cuales permiten detectar un amplio rango de grupos de antimicrobianos en un corto periodo de tiempo, además, de un bajo costo y sus ventajas los hacen ideales para implementarse como pruebas de tamizaje a nivel de camales, puesto que ayuda a que los tiempos de detección de residuos sean breves (Merino, 2006).

2.2.5.1. Microorganismos indicadores

Existe consenso sobre las bondades de las pruebas microbiológicas, basadas en la confrontación de una cepa sensible con la muestra problema, como

prueba cualitativa de aproximación. En el año 1973, aparece en Holanda la prueba del riñón en que emplean *Micrococcus luteus* como cepa sensible. Al año siguiente comienzan a probar, en Alemania Federal, las ventajas de una cepa de *Bacillus subtilis* que denominaron (B.G.A.). Este microorganismo denota gran sensibilidad frente a un amplio número de antibióticos. Surge paralelamente en varios países europeos la inquietud de adoptar y perfeccionar el método a fin de ampliar su espectro a una detención de niveles más bajos de Sulfonamidas y Cloranfenicol, que los logrados a la época, proponiendo el sistema de las cuatro placas que además del empleo de *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* (B.G.A.) incluye una cepa sensible de *Escherichia coli* y dos niveles de pH (Gesche, 1986).

Sin embargo, considerando la conveniencia de hacer menos laborioso el método, continuaron las investigaciones en torno a *Bacillus subtilis* (B.G.A.) como cepa única a diferentes niveles de pH, para aumentar el espectro de captación de antibióticos y la adición de Trimetoprim para potenciar la acción de Sulfonamidas a fin de detectar niveles más bajos de estas sustancias (Gesche, 1986).

En el año 1983, Alemania Federal fijó la prueba de las tres placas como técnica oficial para la detección de antibióticos en carne, en que se concilian aspectos de aplicación práctica y seguridad diagnóstica y es probable que la misma se haga extensiva en el resto de los países de la Comunidad Europea (Gesche, 1986).

2.2.5.2. Técnica rápida: prueba STOP

Prueba STOP (swab test on premises o prueba in situ con torundas); es una prueba que se realiza en placas petri con el agar Müller Hinton, con medio de cultivo *Bacillus subtilis* y discos de neomicina. Cada placa será sembrada con la ayuda de un hisopo previamente introducido en la suspensión de *Bacillus subtilis*. Luego, las torundas de algodón o hisopos estériles son embebidos con fluidos biológicos (hígado, riñón y músculo) y se presionan contra el agar. Un disco de neomicina también será colocado en el centro del cultivo. La placa es incubada a 25 – 35 °C durante 18 – 24 horas y se leen los resultados. La respuesta positiva es indicada mediante una zona de inhibición alrededor de las torundas y discos de

neomicina como controles positivos. Para que sean considerados positivos los halos de inhibición deben ser mayores a 2 mm (Chávez, 2008).

2.2.5.3. Método de las cuatro placas

Este método fue desarrollado por el equipo de trabajo de la Comisión Científica de Veterinaria de la Comisión de las Comunidades Europeas (CCE) en colaboración con expertos de nueve estados miembros de la misma comunidad, aproximadamente en el año 1980. El resultado de este equipo de trabajo fue un método microbiológico estandarizado altamente sensible. El método propuesto es un test de difusión de agar de cuatro placas, en el cual se utilizan dos microorganismos diferentes (*Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* ATCC 9341) (Azareño & Chiroque, 2010).

En realidad el test se basa en otros tests ya existentes, siendo el nuevo elemento la placa que contiene Trimetoprima y *Bacillus subtilis*, con el fin de detectar los residuos de sulfamidas. Básicamente, el test de residuos de antibióticos de la CCE es una combinación del Test alemán: AH-Test, del test *Sarcina lutea* (modificado a pH 8) y una variante del test existente para sulfonamida (Azareño & Chiroque, 2010).

El método de las cuatro placas se basa en el cultivo de un microorganismo en agar que tiene sensibilidad frente a un antimicrobiano o grupos de antimicrobianos determinados que se encuentran como residuos en los tejidos de origen animal o en sus productos. Esta técnica puede ser modificada, para conseguir un amplio espectro de identificación, aumentando una placa con otro grupo de antimicrobianos para ello se juega con la siembra en agares de distinta composición y pH por ejemplo para quinolonas adicionando *Escherichia coli* como bacteria a ser inhibida y el medio nutritivo a pH 7,2 (Azareño & Chiroque, 2010).

2.2.5.4. Método de las tres placas

La prueba de inhibidores en tejidos o Método de las tres placas es una prueba de tamizaje en el que se emplea un procedimiento microbiológico para mostrar la actividad antibacteriana de la sustancia presente en los tejidos. Esta prueba se basa en colocar una muestra de tejido que contenga un inhibidor, sobre un medio nutritivo sólido que contiene una concentración conocida de células bacterianas (*Bacillus subtilis* B.G.A.)(Fig. 1), el inhibidor se difundirá en el medio de cultivo y formará un halo de inhibición alrededor del tejido (Fig. 2). El tamaño de la zona de inhibición es una medida del efecto inhibitorio (Avalos, 2008).

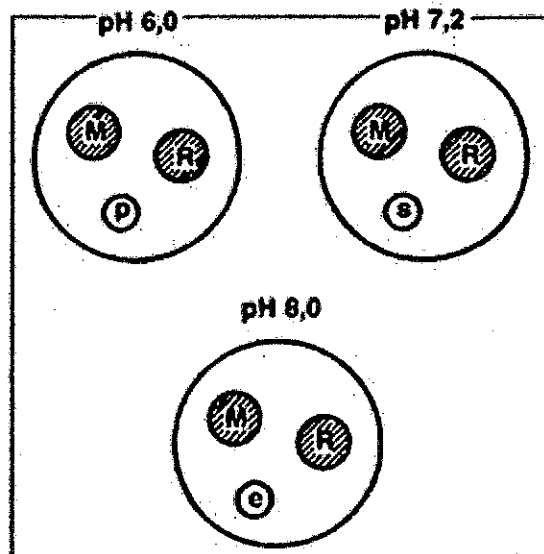


Figura. 1. Medios de cultivos con diferentes niveles de pH que contienen Sensidiscos y trozos de tejidos, siendo: M = músculo, R = riñón, P = penicilina; s = sulfamidas; e = estreptomicina (Gesche, 1986).

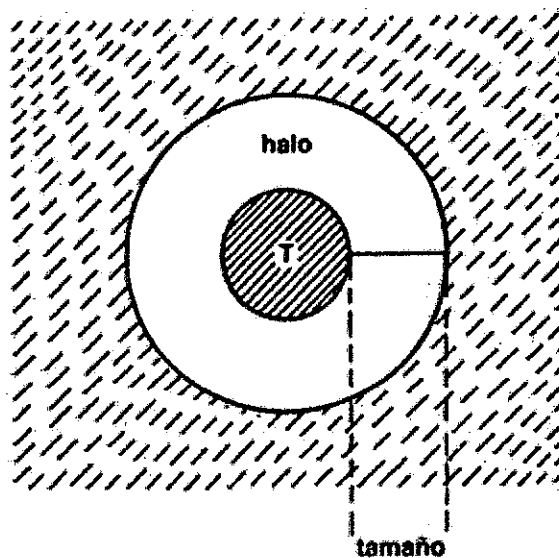


Figura. 2. Determinación del tamaño del halo de inhibición formado alrededor del trozo de tejido (Gesche, 1986).

Tabla 1. Grupo de inhibidores y pH asignado a cada placa en estudio

Grupo de inhibidores	Microorganismo	pH del medio (a 30 °C)
Penicilinas/tetraciclinas	<i>Bacillus subtilis</i>	6,0
Sulfamidas	<i>Bacillus subtilis</i>	7,2
Aminoglucósidos	<i>Bacillus subtilis</i>	8,0

Fuente: Gesche y Emilfork, 1998

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

La toma de muestras se realizó en el Mercado Modelo de Piura del distrito, provincia y departamento de Piura, cuyas coordenadas son 5° 11' 16" latitud Sur 80° 37' 59" longitud Oeste, dirección: Av. Sullana con Av. Mártires de uchuraccay, Piura.

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Nutrición Fisiológica de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional de Piura, ubicado en el distrito de Castilla, provincia y departamento de Piura, entre las coordenadas 5° 15' 42" latitud sur y 80° 40' 22" longitud oeste con altitud media de 20 msnm y humedad relativa de 60-66%, dirección: Urb. Miraflores s/n, Castilla, Piura 295.

3.2. DURACIÓN DEL ESTUDIO

La fase experimental duró 3 meses, comprendidos desde junio hasta agosto del año 2015.

3.3. MATERIALES

3.3.1. Material para toma de muestra

- Guantes de látex descartables
- Bolsas plásticas de polietileno de 7 x 10 cm
- Plumón indeleble negro
- Cooler y refrigerantes de gel
- Jabón líquido
- Cuaderno de registro

3.3.2. Material biológico

- Cepa de *Bacillus subtilis*
- Muestras de hígado

3.3.3. Material de laboratorio

- Jeringas hipodérmicas descartables de 5 y 10 ml de capacidad
- Alcohol de 1 litro al 96% de pureza
- Fósforos
- Algodón hidrófilo estéril de 100 gramos
- Mandil blanco
- Regla milimetrada de 30 cm
- Sacabocados de plástico de 8 mm
- Agua destilada
- Guantes de látex descartables estériles
- Mascarillas descartables
- Tubos de ensayo de 15 ml de capacidad
- Placas Petri de vidrio de 15 ml de capacidad
- Matraz Erlenmeyer de vidrio de 100 ml de capacidad
- Mechero de alcohol
- Probetas de vidrio de 50 ml de capacidad
- Asa de siembra de kolle
- Pinzas estériles de metal
- Gradillas de metal
- Tiras de pH OF™ descartables
- Hisopos de algodón estériles
- Discos comerciales BBL™ de tetraciclina concentración de 30 ug
- Discos comerciales BBL™ de sulfametoxazol/trimetoprim; 23,75 ug/1,25 ug
- Discos comerciales BBL™ de Gentamicina, 10 ug

3.3.4. Medios de cultivo

- Agar nutritivo de 500 gr Merck®, JAMPAR®
- Agua peptonada JAMPAR®

3.3.5. Reactivos

- Ácido clorhídrico (HCl) 1N
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1N

3.4. EQUIPOS

- Balanza digital marca Metler, capacidad de 0,1 mg – 160 mg.
- Cocina eléctrica marca RotableRange 825 watt de 2 hornillas.
- Horno marca Memmert.
- Refrigeradora marca Faeda de 9 pies
- Incubadora eléctrica, marca Memmert
- Autoclave Marca: All American – Electric Pressure Steam Sterilizer – Model NO. 25x.

3.5. METODOLOGÍA

Se tomaron 196 muestras de hígados de pollo de los establecimientos que comercializan este producto en el mercado modelo de Piura, de los cuales se obtuvieron 3 resultados diferentes (penicilinas/tetraciclinas, sulfamidas y aminoglucósidos) para cada una de ellas, haciendo un total de 588 resultados.

El análisis de las muestras se realizó siguiendo el protocolo de la técnica cualitativa de detección de residuos de antibióticos en músculo esquelético animal por el método de las

cuatro placas” (Pérez, 2005), modificada a una prueba de tres placas siguiendo el patrón de las pruebas realizadas por Gesche (1986).

3.5.1. Toma de muestras

- Cada muestra fue registrada en un protocolo de muestreo (anexo 3).
- Las muestras fueron colectadas todos los días en las mañanas, durante el expendio de la carne.
- Las muestras de hígado se tomaron libres de fascia (un hígado completo).
- Cada hígado fue colocado en bolsas de polietileno e identificadas con plumón indeleble.
- Luego fueron transportadas al laboratorio de Nutrición Fisiológica a una temperatura de 4-8 °C, donde fueron congelados a -3 °C, durante 2 horas hasta el momento del procesamiento.

3.5.2. Preparación de Agar test pH 6,0 y pH 8,0 para test de inhibición

El medio de cultivo se preparó un día antes de ser utilizado y fue almacenado en refrigeración.

El medio de cultivo de agar nutritivo tuvo la siguiente composición (gramo/litro):

- Peptona de carne.....3,45 g
- Peptona de caseína.....3,45 g
- Cloruro de sodio.....5,10 g
- Agar Agar.....13,00 g

Se pesó 2,25 g del medio y se suspendió en 100 mL de agua destilada, luego se calentó y agitó suavemente hasta la completa disolución, hirviéndose durante 1 minuto.

Posteriormente se dejó enfriar a una temperatura entre 45-50 °C, este proceso se repitió hasta preparar 3 matraces con 100 mL de medio de cultivo cada uno. El pH de uno de los medios de cultivo no fue modificado (pH 7,2) pero los otros se ajustaron a pH 6,0 y 8,0 con NaOH o HCl al 1N, utilizando cintas de pH OF™. El pH fue controlado antes y después de colocar los medios de cultivo en autoclave. El autoclavado se realizó a 121 °C por 15 minutos, a 15 libras de presión.

3.5.3. Distribución de agar en placas Petri

Terminada la esterilización, los medios de cultivo fueron enfriados a 45 °C y vertidos en placas Petri de 9 cm de diámetro a razón de 12,5 mL; obteniendo una altura de 2 mm. Este procedimiento se realizó con el mechero encendido para asegurar un ambiente estéril que se obtiene por la llama que emite. Las placas servidas fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta la gelificación del agar, luego se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta por una semana (Gesche, 1986).

3.5.4. Obtención, identificación y sembrado en placa de *Bacillus subtilis*

La obtención e identificación de *Bacillus subtilis*, se realizó de acuerdo al protocolo del anexo 2, la cepa obtenida fue conservada en refrigeración a 4 °C. Para el momento de su uso se reactivó la cepa en caldo triptosa a 37°C por 6 horas para luego sembrarla con un hisopo de madera estéril en cada placa petri servida con agar test a diferentes pH.

3.5.5. Procesamiento de muestras

Las muestras de hígado se retiraron del refrigerador y fueron sometidas a temperatura ambiente por 10-15 minutos. Con el sacabocados de 8 mm de diámetro se obtuvieron cilindros de tejido de hígado, que se seccionaron a 2 mm de altura. Los

trozos de tejido se colocaron utilizando pinzas estériles sobre los 3 medios sembrados en placas petri.

El control estuvo representado por los discos comerciales que contenían a los antimicrobianos Tetraciclina (30 ug), Sulfametoxazol/Trimetoprim (23,75ug/1,25 ug) y Gentamicina (10 ug), los cuales fueron colocados, con ayuda de pinzas estériles, en la parte interna inferior de los medios de cultivo con pH 6,0; 7,2 y 8,0, respectivamente. Finalmente se incubaron a 30 °C por 24 horas.

3.5.6. Lectura de resultados

La lectura de los resultados se determinó mediante el tamaño del halo de inhibición del crecimiento de bacterias, causado por la presencia del antimicrobiano en el trozo de tejido. Se utilizó para ello una regla milimetrada. La línea considerada como tamaño estuvo comprendida entre el borde del tejido y el inicio del crecimiento bacteriano.

- **POSITIVO:** Se consideró una muestra positiva cuando tuvo un halo de inhibición claro y total del crecimiento bacteriano superior a 2 mm (Gesche, 1986).
- **NEGATIVO:** Se consideró una muestra negativa cuando tuvo una inhibición del crecimiento bacteriano inferior a 1 mm (Gesche, 1986).
- **SOSPECHOSO:** Se consideró una muestra sospechosa cuando tuvo una inhibición del crecimiento bacteriano de 1 a 2 mm (Gesche, 1986).

3.6. EVALUACIÓN DE DATOS

3.6.1. Unidad de análisis

La unidad de análisis lo constituyó cada hígado de pollo comercializado en el Mercado Modelo de Piura.

3.6.2. Muestra

El tamaño de muestra se determinó aplicando la siguiente fórmula estadística (Mateu, 2003):

$$n = \frac{Z^2 pq}{B^2}$$

Donde:

n= Número de muestras

Z= 1,96 para el 95% de confianza; 2,56 para el 99%.

p= Frecuencia esperada del factor a estudiar

q= 1 - p

B= Precisión o error admitido.

Debido a que no hay trabajos o investigaciones que nos aporten una prevalencia, se estableció la prevalencia del 50% con un margen de error de 7%.

p = 0,5

q= 0,5

B= 0,07

$$n = \frac{Z^2 pq}{B^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,5)(0,5)}{0,07^2}$$

$$n = \frac{(3,8416)(0,25)}{0,0049}$$

n = 196 muestras

Reg. 6527 - 29/4/16 LNP

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN MUESTRAS DE HÍGADOS DE POLLO

El total de muestras fue de 196, de las cuales 68 (34,69%) resultaron positivas, 106 (54,08%) resultaron sospechosas y 22 (11,22%) fueron negativas, considerando que han sido positivas en al menos uno de los antimicrobianos, representado en la Tabla 2 y Figura 3, donde tenemos el porcentaje de hígados del mercado modelo de Piura que resultaron positivos, sospechosos y negativos al método de las tres placas.

Tabla 2.

Porcentaje de hígados obtenidos del mercado modelo de Piura que resultaron positivos, sospechosos y negativos a la prueba de detección de residuos de antimicrobianos

	Número de Hígados	Porcentaje	Intervalo de confianza
Positivos	68	34,69 %	$\pm 11,81\%$
Negativos	22	11,22 %	$\pm 7,83\%$
Sospechosos	106	54,08 %	$\pm 12,37\%$
Total	196	100 %	

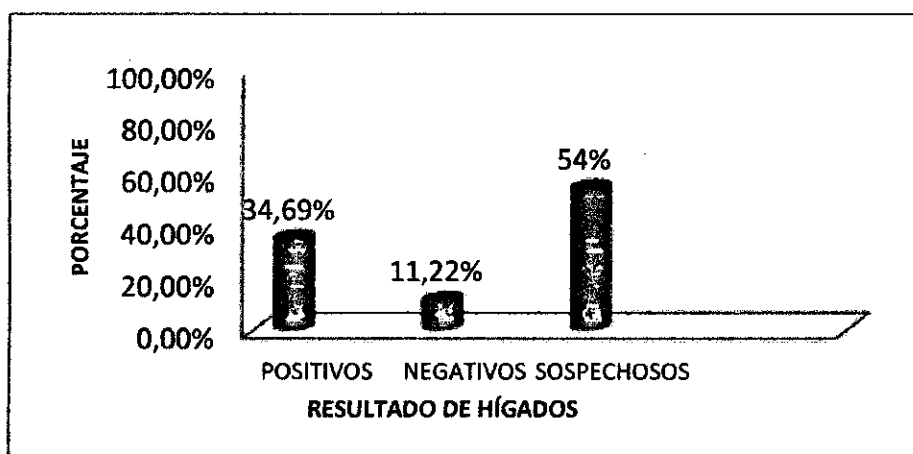


Figura 3. Hígados positivos, negativos y sospechosos al método de las tres placas

3.6.3. Población

La población del estudio estuvo constituida por el número de hígados de pollos comercializados en el Mercado Modelo de Piura.

3.6.4. Diseño y análisis estadístico

El diseño incluye la evaluación de cada unidad experimental frente a 3 fármacos (tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim y gentamicina) con 3 posibles resultados para cada fármaco (Positivo, Sospechoso o Negativo).

La investigación es de tipo descriptiva. Para el análisis de los resultados se utilizaron indicadores estadísticos como el porcentaje de presencia y frecuencia como medida de tendencia central y el intervalo de confianza como medida de dispersión para comparar los datos.

El porcentaje de la presencia de antimicrobianos representado por la letra P se calculó con la siguiente fórmula: (Jaramillo y Martínez, 2010)

$$P = \frac{\text{N}^\circ \text{ de animales positivos} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de animales inspeccionados}}$$

Para el intervalo de confianza (IC) se utilizó la siguiente fórmula: (Jaramillo y Martínez, 2010)

$$IC = P \pm Z \sqrt{pq/n}$$

Donde:

P = porcentaje de presencia obtenido Z = 1,96 q = 1-p
n = Número de muestras.

Con el intervalo de confianza de los positivos y sospechosos podemos deducir que son diferentes estadísticamente. Merino (2006) del análisis de 120 hígados mediante el método de las tres placas, obtuvo un 60,83% de positivos cuyo valor obtenido es superior estadísticamente al encontrado en el presente estudio (34,69%), esto probablemente se debe a que las aves estuvieron expuestas por error o negligencia a tales sustancias poco tiempo antes de ser enviadas al sacrificio.

Orozco y Velásquez (2014) también encontraron en Guatemala residuos de antimicrobianos en carne de pollo, obteniendo de 30 muestras un 10% positivas con niveles de residuos mayores a los aceptables ($\leq 0,25$ ppm) establecidos por la Administración de alimentos y drogas de Estados Unidos, mediante el método de Cromatografía líquida de alta resolución, resultado inferior estadísticamente al resultado en la presente investigación (34,69%), tanto en Guatemala como en Perú no se controla ni regula la presencia de residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal, por lo que se puede deducir que en nuestro país se utiliza con mayor frecuencia antimicrobianos al poco tiempo de ser enviados al sacrificio.

En nuestro país existen muy pocos trabajos de investigación sobre residuos de antimicrobianos en aves, así tenemos que, en el trabajo realizado en Lima, Azareño y Chiroque (2010) analizaron 20 muestras de hígados, encontrando 100% de positivos, además, sostienen que el método microbiológico usado para detectar grupos antimicrobianos es el más accesible y de bajo costo, avalado por la unión europea. Finalmente concluyeron que el tiempo de espera para la eliminación de antimicrobianos o tiempo de retiro no se cumple en las avícolas que proveen pollo a los cuatro mercados que se consideraron en el estudio. Los resultados obtenidos en el estudio de Azareño y Chiroque son muy superiores estadísticamente a los encontrados en este estudio, llegando a la conclusión que en la ciudad de Lima el uso de antimicrobianos es de forma indiscriminada y no se respeta el tiempo de retiro de las sustancias utilizadas a comparación de la ciudad de Piura donde el porcentaje es menor (34,69%), haciendo suponer que el uso de antimicrobianos es más controlado en nuestra ciudad.

4.2. DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN MUESTRAS DE HÍGADO DE POLLO A TRES pH DIFERENTES

Las 196 muestras de hígado se procesaron en tres medios de cultivo con pH diferente cada uno. En el medio de cultivo con pH 6,0; para la determinación de tetraciclinas, 39 muestras se encontraron positivas (19,89%), 57 muestras negativas (29,08%) y 100 muestras resultaron sospechosas (51,02%); en el medio de cultivo con pH 7,2; para la determinación de sulfametoxazol/trimetoprim, 34 muestras se encontraron positivas (17,34%), 48 muestras fueron negativas (24,48%) y 114 muestras resultaron sospechosas (58,16%); mientras que en el medio de cultivo con pH 8,0; para la determinación de gentamicina, 14 muestras se encontraron positivas (7,14%), 67 muestras fueron negativas (34,18%) y 115 muestras resultaron sospechosas (58,67%).

Los resultados positivos, negativos y sospechosos a la detección de Tetraciclinas (pH 6,0); Sulfametoxazol/Trimetoprim (pH 7,2) y Gentamicina (pH 8) en las muestras de hígados analizadas, están representados en la Tabla 3 y Figura 4.

Tabla 3.

Resultados a la detección de tetraciclinas (pH 6,0); sulfametoxazol/trimetoprim (pH 7,2) y Gentamicina (pH 8) en muestras de hígado de pollo

LECTURA	pH 6 Tetraciclina			pH 7,2 Sulfametoxazol/ Trimetoprim			pH 8 Gentamicina		
	Total	%	IC	Total	%	IC	Total	%	IC
POSITIVOS	39	19,89	±9,91	34	17,34	±9,40	14	7,14	±6,39
NEGATIVOS	57	29,08	±11,27	48	24,48	±10,67	67	34,18	±11,77
SOSPECHOSOS	100	51,02	±12,40	114	58,16	±12,24	115	58,67	±12,22
TOTAL	196	100,00		196	100,00		196	100,00	

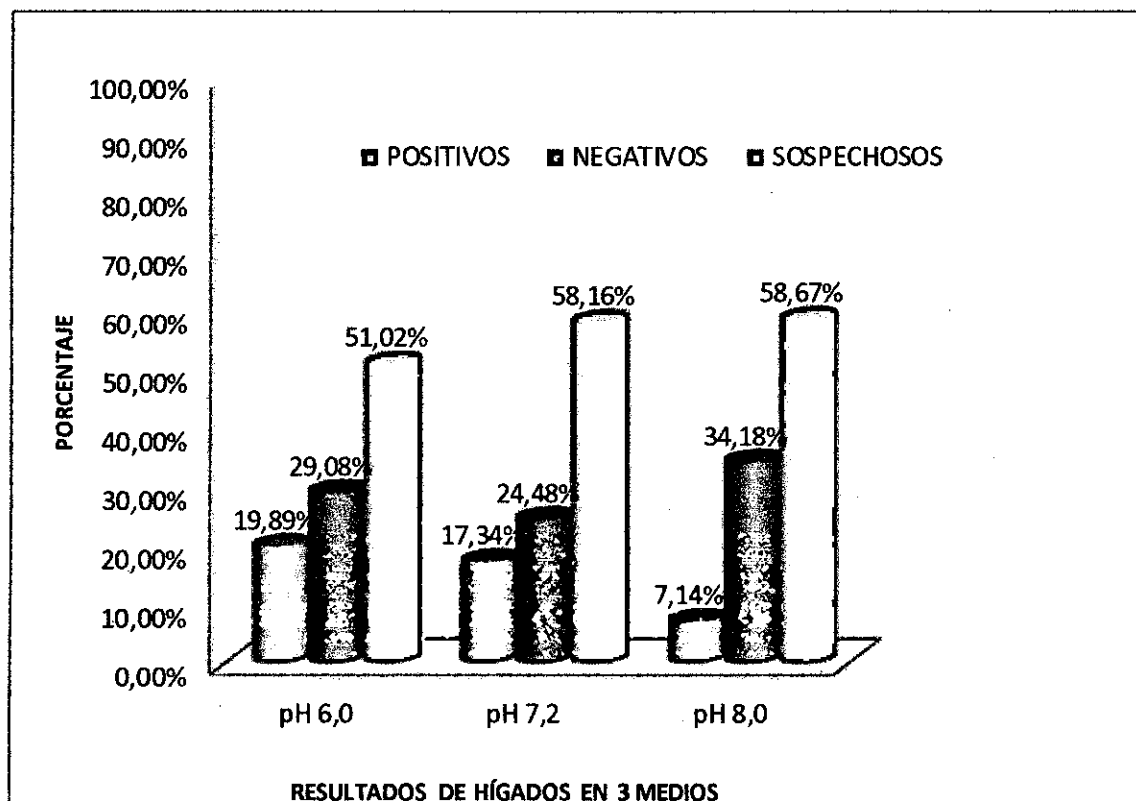


Figura 4. Hígados positivos, negativos y sospechosos en el medio pH 6,0; pH 7,2 y pH 8,0

Con los siguientes resultados tenemos que tanto el medio con pH 6,0 como el medio con pH 7,2 son similares estadísticamente y ambos presentaron resultados positivos más altos que los encontrados en el medio con pH 8,0; esto quiere decir que en gran parte las muestras procesadas presentaron más restos de tetraciclina y sulfametoxazol/trimetoprim y en menor cantidad restos de gentamicina. Además los tres medios presentaron resultados sospechosos estadísticamente similares, determinando 100 muestras sospechosas a pH 6,0 (51,02%), 114 muestras sospechosas a pH 7,2 (58,16%) y 115 muestras sospechosas a pH 8,0 (58,67%), esto nos hace suponer que los pollos de donde procedían las muestras no sólo han sido expuestos a una clase de antimicrobiano sino a varios a la vez.

Este resultado se asemeja a lo expuesto por Sumano y Gutiérrez (2010), quienes expresan que tanto las tetraciclinas y las sulfonamidas son tiempo - dependientes, esto quiere decir que su efecto es eficaz a una determinada concentración en un prolongado periodo de tiempo a diferencia de la gentamicina que es concentración dependiente, es decir se necesitan altas dosis en un corto periodo de tiempo para lograr el efecto deseado, además sostienen que la gentamicina no se absorben por vía gastrointestinal por lo que si se utilizan por vía oral son

para resolver problemas solo digestivos específicamente; con esto se puede concluir que tanto las tetraciclinas y las sulfonamidas son más utilizadas que la gentamicina por el costo/beneficio y para problemas generales.

4.3. DETECCIÓN DE HÍGADOS POSITIVOS EN 1, 2 O 3 MEDIOS CON DIFERENTE PH

Las muestras analizadas presentaron más de un antimicrobiano, siendo 2 muestras positivas en los 3 medios de cultivo a diferente pH (2,94%), 15 muestras positivas en 2 medios (22%) y 51 muestras positivas en un solo medio de cultivo (75%), estos resultados de positivos en 3 medios, 2 medios y un medio están representados en la Tabla 4 y Figura 5.

Tabla 4

Resultado de hígados positivos en 3 medios, 2 medios y en un medio a diferentes pH

POSITIVOS	TOTAL RESULTADOS	PORCENTAJE	IC
POSITIVOS EN 3 MEDIOS	2	2,94%	$\pm 7,12\%$
POSITIVOS EN 2 MEDIOS	15	22,05%	$\pm 17,47\%$
POSITIVOS EN 1 MEDIO	51	75,00%	$\pm 18,24\%$
TOTAL POSITIVOS	68	100,00%	

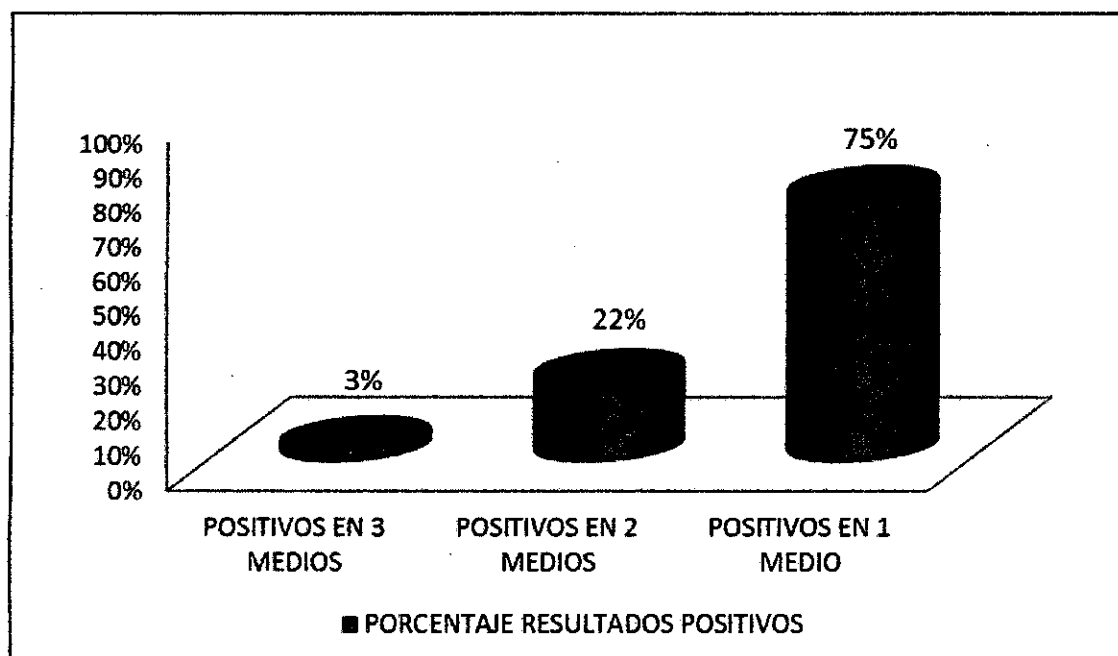


Figura 5. Resultado de hígados positivos a antimicrobianos en los diferentes medios.

Con estos resultados se llega a la conclusión que las muestras procesadas presentaban más de un antimicrobiano, incluso dos muestras resultaron positivas para 3 antimicrobianos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Los hígados de pollo comercializados en el Mercado Modelo de Piura presentan residuos de antimicrobianos.
- Los hígados de pollo comercializados en el Mercado Modelo de Piura presentan residuos de Tetraciclina,
- Los hígados comercializados en el Mercado Modelo de Piura presentan residuos de Sulfametoxazol/Trimetoprim
- Los hígados comercializados en el Mercado Modelo de Piura presentan residuos de Gentamicina.
- Los residuos de antimicrobianos más frecuentemente encontrados en los hígados de pollo fueron de Tetraciclina, seguidos de Sulfametoxazol/Trimetoprim y Gentamicina.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

1. Las autoridades de salud deben promover y utilizar técnicas para detectar residuos de antimicrobianos en carnes y vísceras de origen animal para consumo humano para conocer si son aptos para la alimentación.
2. Realizar trabajos de investigación utilizando métodos cuantitativos para conocer la concentración de los residuos antimicrobianos que se pueden encontrar en las diferentes carnes o vísceras comercializadas en los mercados y supermercados de Piura.
3. La técnica microbiológica cualitativa utilizada en el presente trabajo es de gran utilidad para el estudio de residuos de antimicrobianos en carnes y vísceras por su confiabilidad, fácil ejecución y bajo costo; por lo que se recomienda emplearse como método de rutina en la vigilancia de residuos antimicrobianos en alimentos de origen animal.
4. Es necesario que los médicos veterinarios y empresas privadas mejoren las medidas de bioseguridad en los establecimientos avícolas, además de un uso adecuado de antimicrobianos y cumplimiento del tiempo de retiro antes del sacrificio.

CAPÍTULO VII

RESUMEN

El presente estudio se realizó entre los meses de junio a agosto del 2015 y tuvo como objetivo determinar la presencia de residuos de antimicrobianos (tetraciclina, Sulfametoxazol/Trimetoprim y gentamicina) en hígados de pollo comercializados en el mercado modelo de Piura, mediante el método microbiológico de las tres placas, para lo cual se usó 196 hígados frescos. De cada muestra obtenida se analizaron trozos de 8 mm de diámetro y 2 mm de espesor los que fueron depositados sobre el medio test sembrado con *Bacillus subtilis* y ajustado a pH 6,0; 7,2 y 8,0, además, se colocaron discos de tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim y gentamicina, respectivamente. Midiendo el tamaño del halo de inhibición de crecimiento de *Bacillus subtilis*, se pudo determinar que 68 hígados (34,69%) resultaron positivos, 22 hígados (11,22%) resultaron negativos y 106 hígados (54,08%) resultaron sospechosos a la prueba, llegando a la conclusión de que los hígados de pollos comercializados en el mercado modelo de Piura presentan residuos de los antimicrobianos analizados. Los residuos de antimicrobianos más frecuentemente encontrados en los hígados de pollo fueron de Tetraciclina, seguidos de Sulfametoxazol/Trimetoprim y Gentamicina.

Palabras claves: *Antimicrobiano, hígado, método de las tres placas, pollo, penicilina, tetraciclina, sulfametoxazol, trimetoprim, gentamicina, Bacillus subtilis*

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, R. (2003). *Farmacología y terapéutica Veterinaria*. 2da edición. España: Editorial Acribia.
2. Avalos, E. (2008). *Determinación de residuos de sulfametazina por el método de inmuno ensayo enzimático absorbente (Eliza) en tejidos de bovinos y cerdos sacrificados en el rastro de Tonalá, Jalisco* (Tesis de título profesional). Recuperado de: <http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/5603>
3. Azañero, P. & Chiroque, M. (2010). *Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado*. (Tesis de título profesional, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú). Recuperado de: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1633>.
4. Botana, L. (2002). *Farmacología y terapéutica veterinaria*. España: McGraw-Hill interamericana.
5. Cancho, B., Garcia, M. S. & Simal, J (2000). *El uso de antibióticos en la alimentación animal. Revista científica y técnica de alimentos*, Vol. (3). Recuperado de: <http://webs.uvigo.es/altaga/cyta/cyta-3-2000-39-47.pdf>
6. Chávez, E. (2008). *Utilidad de una prueba microbiológica en la detección de residuos de sustancias inhibidoras de crecimiento bacteriano en orina de bovinos*. (Tesis inédita de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú.
7. Chiara, F. (2013). *Determinación de residuos de antimicrobianos en carne e hígado de bovinos sacrificados en el camal frigorífico municipal de Piura por el método microbiológico con Bacillus subtilis*. (Tesis inédita de título profesional). Universidad Nacional de Piura. Piura Perú.
8. Gesche, E. (1986). *Detección de residuos de antibióticos en carne. Técnica de Bacillus subtilis B.G.A*. Monografías de Medicina Veterinaria. Recuperado de: http://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_seccion/0,1419,SCID%253D13800%2526ISID%253D413,00.html
9. Gesche, E & Emilfork, C. (1998). *Residuos de antimicrobianos en canales de vacas*. Arch. Med. Vet. Chile. Recuperado de: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X1998000200014&lng=en&nrm=iso&tlng=es

10. Gordon, R.E. (1990), *The genus Bacillus*. In: O'Leary, W. *Practical handbook of microbiology-bergey's manual*. Brasil. Boca Raton: CRC. p.109-126.
11. Jaramillo, C & Martínez, J. (2010). *Epidemiología veterinaria*. Editorial manual moderno. México. Pág. 198.
12. Mateu, E. (2003). "*Tamaño de muestra*". Revista epidemiológica de medición de prevalencia. Recuperado de:
http://www.insbaixcamp.cat/moodle/pluginfile.php/23190/mod_resource/content/1/C%C3%A0lcul%20de%20mostres%20poblacionals.pdf
13. Merino, T. (2006). *Determinación de residuos de sustancias antimicrobianas en gallinas de postura* (Tesis de título profesional, Universidad de Guadalajara, México). Recuperado de:
<http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/5647>
14. Orozco, P.Q. & Velásquez, R. (2014). *Determinación de residuos de tetraciclina en carnes de pollo que se consumen en la ciudad de Guatemala* (Tesis de título profesional). Recuperado de:
http://revistaiiqb.usac.edu.gt/index.php/revista_cientifica/article/download/158/pdf_151
15. Pérez J. (2005). *Ensayos de Familiarización en la Técnica de Detección de Residuos de Antibióticos y Sulfamidas en Musculo Esquelético Animal por el Método de las Cuatro Placas*. (Tesis de maestría, Universidad de Belgrano, Argentina). Recuperado de: http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/146_perez.pdf
16. Serrano L. (2015). *Biodisponibilidad de los antimicrobianos en los nuevos sistemas de producción*. Asociación Peruana de Avicultura. Recuperado de:
<http://www.apa.org.pe/html/sections/presentaciones/biodisponibilidad.asp>
17. Sumano, H. (2006). *Farmacología veterinaria*. 3ra edición, México: Ed McGraw-Hill.
18. Sumano, H & Gutiérrez, L. (2010). *Farmacología clínica en aves comerciales*. 4ta edición, México: Editorial McGraw-Hill.
19. Trollidenier, H. (1980). *Antibióticos en medicina veterinaria*. España: Acribia.
20. Zuñiga, R. (2010). *Adaptación de la técnica de las tres placas para la detección de residuos de sustancias inhibidoras de crecimiento bacteriano en carne bovina comercializada en mercados minoristas del distrito de san Martín de Porres*. (Tesis inédita de maestría) Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Perú.

ANEXOS

ANEXO 1:
FOTOS DE TOMAS DE MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO



Foto 1. Lugares de venta de hígados de pollo en mercado modelo de Piura



Foto 2. Identificación de las muestras en bolsas de polietileno



Foto 3. Muestras transportadas a 4-8 °C



Foto 4. Muestras en el laboratorio para su congelación a -18 C°



Foto 5. Preparación de medios



Foto 6. Ajuste del medio a pH 8,0 con NaOH al 1N, utilizando cintas de pH



Foto 7. Ajuste del medio a pH 6,0 con HCL al 1N, utilizando cintas de pH

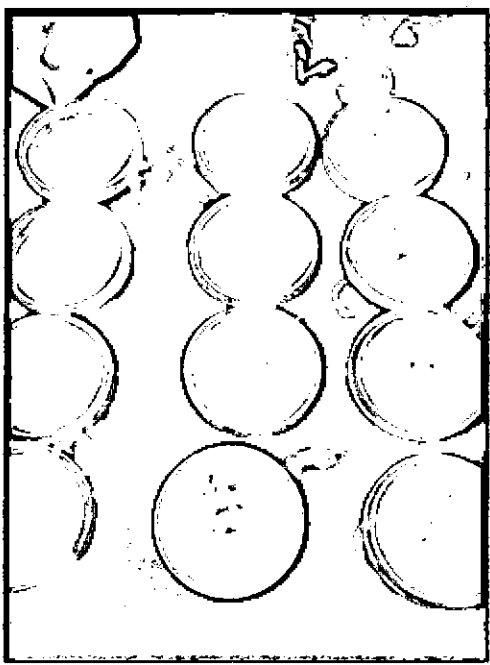


Foto 8. Servido de medios de cultivo en placas Petri.

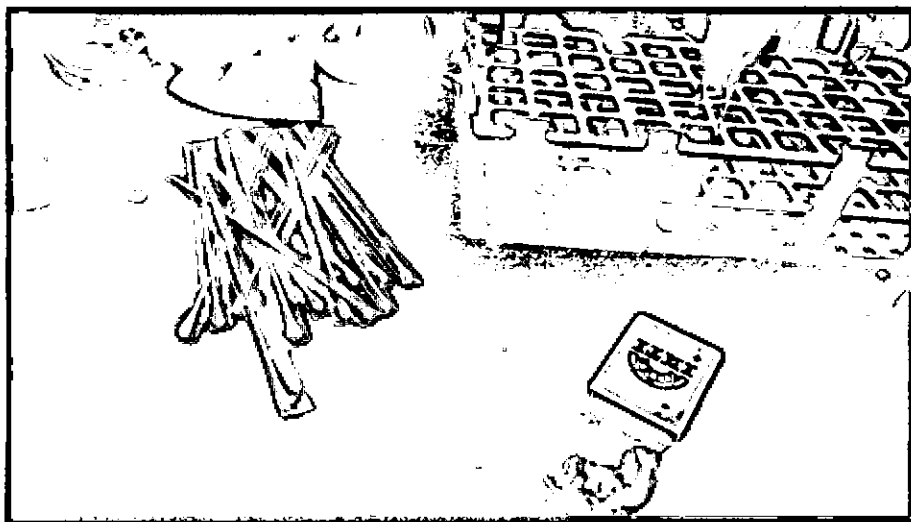


Foto 9. Sembrado de *Bacillus subtilis* utilizando hisopos estériles

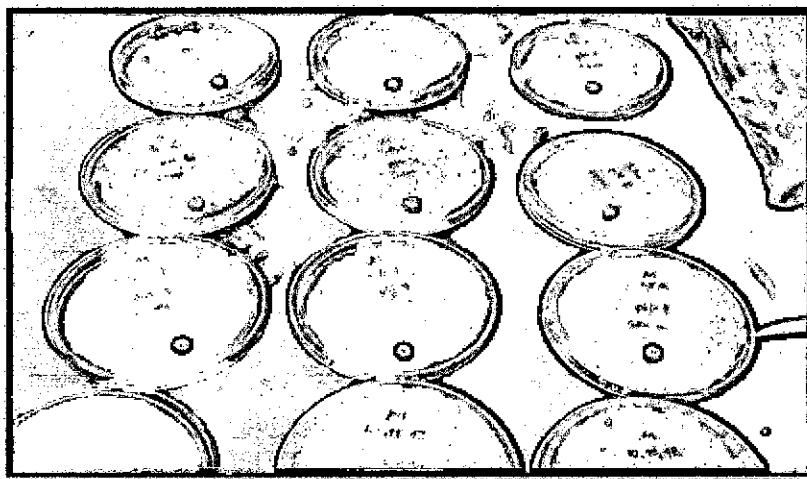


Foto 10. Pegado de discos de antibióticos en medios con pH respectivo

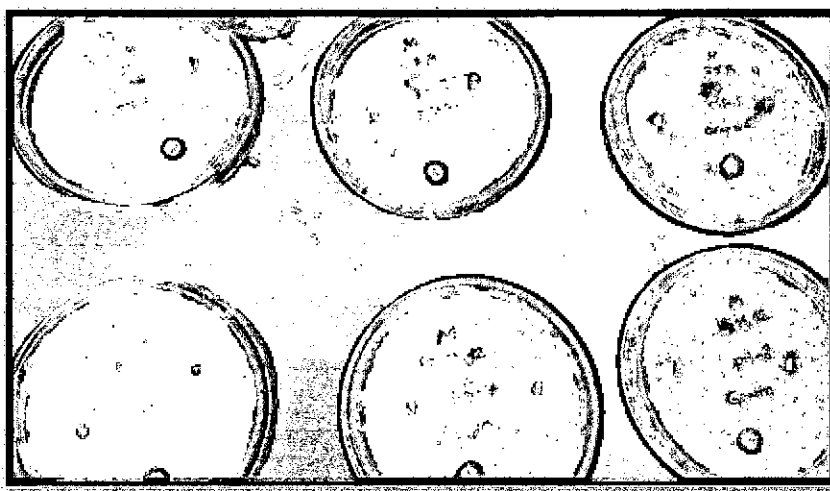


Foto 11. Pegado de hígado en los medios, 3 muestras diferentes de hígado por placa

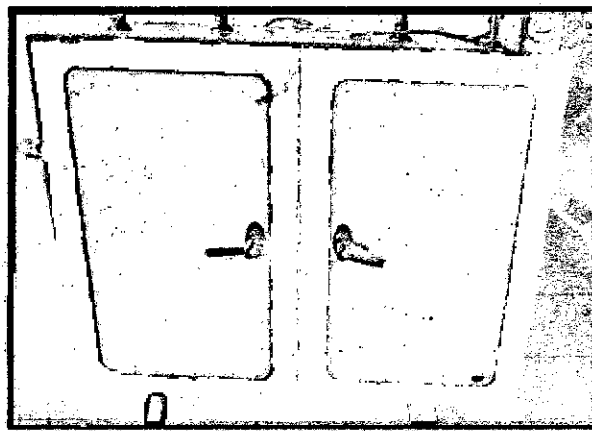


Foto 12. Incubación de medios de cultivo a 30°C por 24 horas

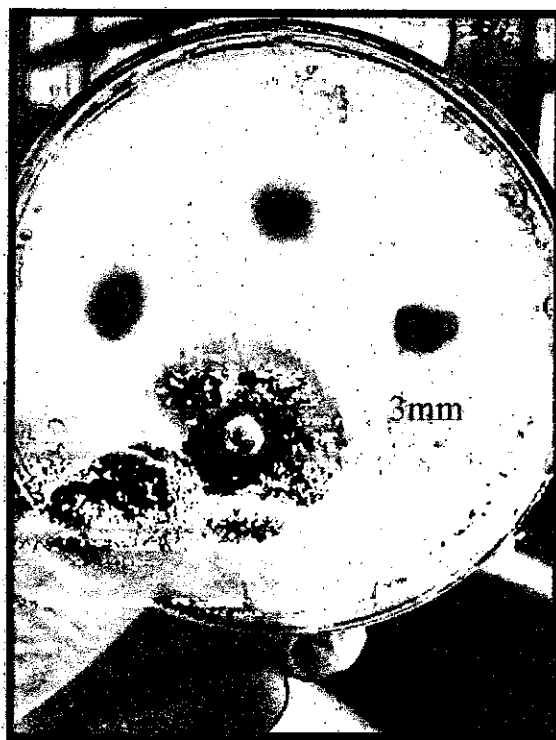


Foto 13. Lectura positiva de resultados, en medio pH 6,0 con un halo de inhibición de 3mm



Foto 14. Lectura negativa de resultados, no presentan halo de inhibición

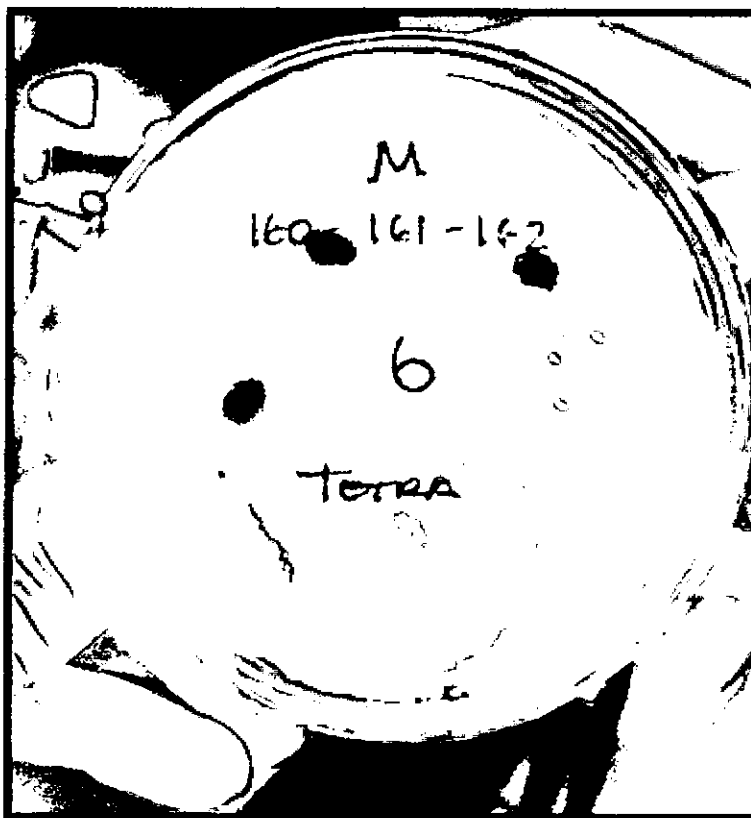


Foto 15. Lectura sospechosa de resultados, con halo de inhibición entre 1 y 2 mm

ANEXO 2

OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus subtilis*

Para la obtención de los agentes de control biológico (*Bacillus subtilis*) se preparó una placa Petri con agar nutritivo y se dejó abierta al medio ambiente por 10 minutos. Luego se cerró e inmediatamente se incubó la placa a 37 °C por 24 horas. Pasado las 24 horas se efectuó un análisis de las colonias de microorganismos que crecieron en la placa, fueron identificados, purificados y almacenados en refrigeración en la misma placa hasta su reactivación para ser utilizadas.

Todos los aislamientos de *Bacillus* spp. obtenidos fueron identificados sometiéndolos primero a las pruebas de morfología celular con tinción Gram y luego a las pruebas bioquímicas de la especie *Bacillus subtilis*, realizándose un procedimiento semejante al aplicado por Gordon (1990). La caracterización microscópica de *Bacillus subtilis* se realizó con la tinción de Gram, observándose bacilos esporulados gram positivos y las pruebas bioquímicas más representativas para identificar a *Bacillus subtilis* utilizadas fueron: crecimiento en medio SIM (Hidrogeno sulfurado, Indol y Motilidad) positivo para motilidad, en la prueba de carbohidratos (glucosa, manitol, sacarosa y lactosa) resultó positiva como bacteria fermentadora, licuó la gelatina en un determinado tiempo, fue urea y catalasa positiva y utilizó el citrato como única fuente de carbono, en medio para confirmación de carbohidratos TSI resultó fermentadora de lactosa y glucosa (A/A) ácido/ácido y descarboxiladora de la lisina (+)(Gordon, 1990).

ANEXO 3

PROTOCOLO DE MUESTREO

[illegible]